

Title of Prior Art

Japanese Published Patent Application No. Sho. 62-71861

Date of Publication: September 11, 1986

Concise Statement of relevance

This prior art reference is described in the specification.

⑪ 公開特許公報(A)

昭62-71861

⑫ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)4月2日

G 01 N 33/543
33/531A-7906-2G
B-7906-2G

審査請求 有 発明の数 2 (全8頁)

⑭ 発明の名称 免疫反応成分測定法及び該方法を実施するための試薬

⑮ 特 願 昭61-212867

⑯ 出 願 昭61(1986)9月11日

優先権主張 ⑰ 1985年9月12日 ⑱ 西ドイツ(DE) ⑲ P3532626.3

⑳ 発 明 者 ウルマン・シュミット ドイツ連邦共和国オーベルハウゼン・ヴァルトシュトラ
ーセ 36㉑ 発 明 者 ゲルト・クラインハマ ドイツ連邦共和国トゥフリング・クロイツェックシュトラ
ーセ 3

㉒ 発 明 者 ロルフ・デアーク ドイツ連邦共和国ベルンリート・ヒルテンシュトラーセ 7

㉓ 出 願 人 ベーリンガー・マンハ イム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレ
ンクテル・ハフツング ーセ 116

㉔ 代 理 人 弁理士 矢野 敏雄 外1名

明 細 書

1 発明の名称

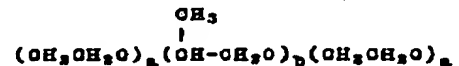
免疫反応成分測定法及び該方法を実施するた
めの試薬

2 特許請求の範囲

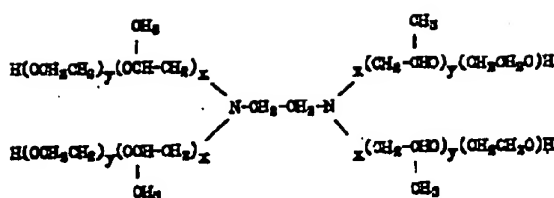
1. 反応成分の1つが固相に存在する免疫反応
の成分を、温度15〜40℃で免疫検定原理
により測定するための方法において、20よ
り大きいHLB値を有する界面活性剤を添加す
ることを特徴とする免疫反応成分測定法。2. 測定を血漿試料中で実施する特許請求の範
囲第1項記載の方法。3. 界面活性剤として、炭素原子数2〜4のア
ルキレンジアミンを中心分子として有してい
てよい、炭素原子数2〜4のアルキレンオキ
シドをベースとする非イオン系ブロックコポ
リマーを使用する特許請求の範囲第1項又は
第2項記載の方法。4. HLB値2.4〜3.0の界面活性剤を使用する
特許請求の範囲第1項から第3項までのいず

れか1項記載の方法。

5. 界面活性剤として、一般式I

〔式中、aは30〜150の間の値であつて
よく、bは15〜60の間の値であつてよい〕
の化合物を使用する特許請求の範囲第1項か
ら第4項までのいずれか1項記載の方法。6. 式中、aが60〜100の間の値であり、
bが25〜40の間の値であるブロックコポ
リマーを使用する特許請求の範囲第5項記載
の方法。7. 親水性ポリオキシエチレン基の部分が60
〜90%を示すブロックコポリマーを使用
する特許請求の範囲第4項から第6項までの
いずれか1項記載の方法。

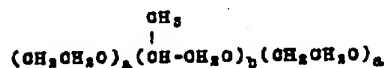
8. 界面活性剤として式I:



〔式中、 x は10～50の間の値を有してよく、 y は30～150の間の値を有してよい〕の化合物を使用する特許請求の範囲第1項から第4項までのいずれか1項記載の方法。

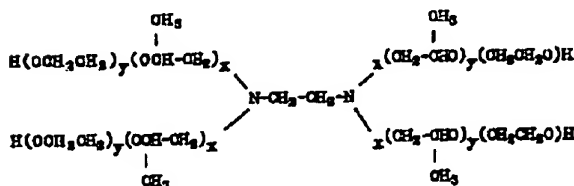
9. 式中、 x が15～30の間の値を有し、 y が40～120の間の値を有するブロックコポリマーを使用する特許請求の範囲第8項記載の方法。
10. ポリオキシエチレン基の部分が50～90多である特許請求の範囲第8項又は第9項記載の方法。
11. 界面活性剤を恒温保持溶液と共に添加する特許請求の範囲第1項から第10項までの

16. 界面活性剤が、一般式I



〔式中、 a は30～150、有利には60～100の間の値であり、 b は15～60、有利には25～40の間の値である〕の化合物である特許請求の範囲第13項から第15項までのいずれか1項記載の試案。

17. 化合物が60～90多のポリオキシエチレン基部分を有する特許請求の範囲第16項記載の試案。
18. 界面活性剤が一般式I



いずれか1項記載の方法。

12. 界面活性剤を全溶液に対して0.1～5%の濃度で添加する特許請求の範囲第1項から第11項記載の方法。
13. 反応成分の1つが固相に存在する免疫反応の成分を、温度15～40℃で免疫検定原理により測定するための、可動化及び非可動化免疫反応成分を含有する試薬において、20より大きなHLB値を有する界面活性剤を含有することを特徴とする免疫反応の成分測定試薬。
14. 界面活性剤として、炭素原子数2～4のアルケレンジアミンを中心分子として有してよい、炭素原子数2～4のアルケレンオキsidをベースとする非イオン系ブロックコポリマーを含有する特許請求の範囲第13項記載の試案。
15. 界面活性剤が24～30の間のHLB値を有する特許請求の範囲第13項又は第14項の試案。

〔式中、 x は10～50、有利に15～30の間の値であり、 y は30～150、有利に40～120の間の値である〕の化合物である特許請求の範囲第13項から第15項までのいずれか1項記載の試案。

19. 該化合物が50～90多のポリオキシエチレン基部分を有する特許請求の範囲第18項記載の試案。
20. 検酸化合物として使用した感度活性を検出するためのシステムを含有する特許請求の範囲第13項から第19項までのいずれか1項記載の試案。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は温度15～40℃で免疫検定原理により免疫反応の成分を測定するための方法に關し、この免疫反応成分の1つは固相に存在する。

従来技術

免疫測定法は広く行なわれている。この際、均一相での反応も、不均一相での反応もある。

不均一相での実施形において、反応成分の1つは担体に結合している。不均一相での免疫測定の実施のためには種々の方法、例えばサンドイッチ法、間接法及び競合法が公知である。サンドイッチ法においては抗原を担体に結合し、テスト溶液を添加し、この際テスト溶液中に含有される特別な抗原は抗体に結合する。次いで抗原抗体複合体に關して又は該複合体の一部に關しては特異的な標識抗体を添加し、該抗体が複合体に結合する。次いで標識抗体を介して抗原の量を計算することができる。間接法においては抗原が担体材料に結合している。テスト溶液をこれに加え、この際テスト溶液に含有されている、吸着された抗原に關して特異的な抗体が抗原と反応する。標識された抗グロブリンの添加において抗グロブリンは抗原抗体複合体に結合し、テスト血清中の未知の抗体の量は標識抗グロブリンを介して再び測定することができる。競合法においては免疫反応の結合成分の1つが担体材料に結合している。次いで、未知量の免

疫反応の他の成分 有し、かつ免疫反応の標識された他の成分公知量を含有する溶液を加える。標識された成分と非標識の成分は担体に結合した免疫反応成分の結合位を競合する。更に、第2の試料に標識成分のみを含有する標準溶液を加える。標準及び試料中の標識成分の測定により、その差から未知量反応成分を計算する。

測定のためのもう1つの可能性は抗体又は抗体フラグメントであつてよい3種のレセプターを用いて少なくとも2種の抗原に對して得られる。不均一相中の3種のレセプターでの免疫検定の実施において、3種のレセプターの1種は常に不溶性であり、他の2種は可溶性であり、この際両方の可溶性のレセプターの1種は標識されており、他方は標識されていない。不溶性レセプターは非標識可溶性レセプターに向けられている。測定の実施のためには種々の方法が可能であり、1工程法でも、個々のレセプターの添加を逐次行うことができる多工程法であつてもよい。

もう1つの方法は試料中の測定すべき抗原を第1の工程で可溶性で非標識のレセプター及び可溶性標識レセプターと同時に溶液中で混合し、次いで生じた可溶性サンドイッチ複体を第2の工程で不溶性レセプターに結合させることにより不溶性にすることよりなる。

反応成分の標識のためには種々の可能性が公知である。こうして反応成分の1つを放射性に標識することができ、この際測定した放射能は測定すべき反応成分の計算を可能とする。更に、酵素で標識することもできる。免疫測定の通常の工程の実施後、標識として使用した酵素のための基質を添加し、次いでこの反応を介して測定すべき反応成分の濃度を計算する。もう1つの可能性は螢光物質での標識であり、この螢光を直接測定することができるか、又は色素と共に進行すが、この際評価はスペクトル分析又は光度測定により行なわれる。

免疫検定は非常に感度が高く、かつこの方法により物質はピコグラムの範囲まで検出される

ので重要性が増している。しかしながら、不均一相での免疫測定は異なる程度に分析に特異的でない干渉、いわゆる非特異的妨害により誤差を生じ、これはすでに「マトリックス効果」、「バックグラウンド」及び「非特異的結合」と呼ばれている。測定すべき物質の検出は血清試料におけるより血漿試料において明らかに低いということが妨害の関与を明らかにしている。この非特異的な妨害は一部未知の試料成分に起因する。同様に、免疫測定の感度は使用した免疫試薬との又は分析試薬との妨害ファクターの非特異的相互作用により悪くなる。血清中での免疫測定においてより血漿中での免疫測定において非特異的妨害は強く現われるということを強調することができた。従つて、測定における検出は血清においてより血漿において著しく低く、他方競合テストにおいては血漿中での検出は高すぎる。従つて、この妨害の原因は血漿中には存在するが、血清中にはもはや存在しない凝固タンパク質に起因する。凝固タンパク

質は担体材料の表面上に付着し、こうして抗原抗体反応もしくは抗原抗体反応を妨害する。

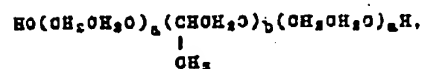
非特異性の相互作用を減少させるために、免疫測定において恒温保持媒体に一定の界面活性剤を添加することは従来公知である。しかしながら、この方法の欠点は所望の、すなわち分析特異性抗原抗体反応にその程度において影響を与え、これにより再び感度の減少を引き起こすということである。更に、界面活性剤の公知適用においては、固体相免疫検定において界面活性剤が吸着的に結合している分子を固体表面から押しのけるという問題も生じた。免疫検定の検定はこれにより著しく妨害される。

フクイン20のような界面活性剤が恒温保持装置中でプラスマ通用性(Plasmagängigkeit)をつくることは公知である。しかしながら、この種の界面活性剤は、これが0.01より高い濃度において担体材料に結合している反応成分を分離させ、このことは再び免疫測定にマイナスの影響を与えるという欠点を有している。

免疫測定において不所望な反応を抑圧することができ、同時に抗体と抗原もしくはヘプタンの間の反応を妨げることも、吸着的に結合した反応成分の脱着に作用することもないということが確実なことは意外であつた。酵素活性の妨害も認められなかつた。更に、本発明による薬剤の添加は免疫反応の促進に導く。

20を超えるHLB値を有する界面活性剤として、場合により中心分子(Zentralkomplex)として炭素原子数2~4のアルキレンジアミンを有してよい、炭素原子数2~4のアルキレンオキッドをベースとする非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤を使用するのが有利である。

有利なブロックコポリマーは一般式I



(式中、aは30~150、特に有利に60~100の間の値であつてよく、かつbは15~

発明が解決しようとする問題点

本発明の目的は、不均一相における免疫測定において非分析特異的、したがって不所望な非特異的妨害が押さえられている方法を見出すことであつた。更に、抗体及び抗原/ヘプタンの間の反応を妨害せず、かつ吸着的に結合した反応成分を担体から脱着させず、かつ濃縮剤として酵素免疫検定試薬を使用する時、酵素活性を減少させない方法を見出すことが本発明の目的であつた。本発明のもう1つの目的は免疫反応の促進であり、これによる分析時間の短縮でもある。

問題点を解決するための手段

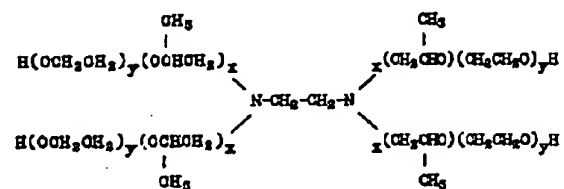
これらの目的を達成するため、本発明は反応成分の1つが固相である免疫反応の成分を温度15~40℃で免疫検定原理により、測定するために、20より大きいHLB値を有する界面活性剤を添加することを特徴とする免疫反応成分測定法を提案している。

20より大きいHLB値を有する界面活性剤は

60、特に有利に25~40の間の値であつてよい]の化合物である。これらの化合物はポリキサマー(Poloxamer)と呼ばれる。商品名は例えばプルロニク(Pluronic®)である。

ポリキサマーの基において、全分子中の親水性ポリオキシエチレンの部分が60~90%である化合物が特に好適である。

更に、有利であるのは一般式I



(式中、xは10~50、特に有利に15~30の値であつてよく、yは30~150、特に有利に40~120の値であつてよい)のブロックコポリマーであり、これはポリキサミン(Poloxamine)と呼ばれる。このようなポリキサミンの市販名は、例えばアトロニク

(Tetronio®)である。前記の界面活性剤のうち、HLB値が24~30のものが最も有利である。

界面活性物質を反応混合物の重量に対して0.1~5%の量で使用する。

本発明の方法において、親水性ポリオキシエチレン基の部分が50~90%を有するポリオキサミンを使用するのが特に有利である。

本発明による界面活性剤の添加は、血漿への凝集においても、血清への凝集においても有利である。両方の場合において、反応の促進が現われ、非特異的妨害の阻止、このために特に血漿中でこの時に凝集を測定が遠せられる。

本発明方法はすべての種類の血漿に適用して適用可能である。こうして安定化のためにEDTAと混合した血漿にも、ヘパリン又はクエン酸と混合した血漿にも使用することができる。

界面活性剤の添加は測定に使用した溶液すべてにおいて行なうことができる。二工程法においては、両方の緩衝剤に、すなわち両工程のそ

る場合、この界面活性剤の濃度は非常に高くなければならない。しかしながら、この非常に高い濃度においては不所望な作用が現われることがある。

本発明による方法を実施するために、免疫反応の可動性及び非可動性成分を含有し、かつ20より大きいHLB値を有する界面活性剤を含有することを特徴とする試薬を使用する。該試薬は更に常用の内容物を含有してよい。有利には緩衝物質、例えば磷酸塩緩衝液、クエン酸塩緩衝液、細胞塩緩衝液等及び/又は牛血清アルブミン又は/及び保存液を含有するのが有利である。免疫反応における酵素活性を検出するためのシステムを含有する。

該試薬が界面活性剤として、炭素原子数2~4のアルキレンジアミンを中心分子として有していてもよい炭素原子数2~4のアルキレンオキサイドをベースとする非イオン系ブロックコポリマーを含有しているのが有利である。界面活

性剤を添加する時特に良好な結果が得られる。更に、1方の反応成分を有する固相を緩衝剤及び添加物、例えばIgGを含有する第1の恒温保持溶液で先ず処理する。その後、洗浄し、引き続き第2の工程で凝合体溶液を添加し、新たに恒温保持する。

凝合体溶液は凝合体及び緩衝剤並びに場合によりその他の常用の添加物を含有している。該凝合体は測定すべき物質のための又は固相成分のための免疫学的反応成分から成り、例えば補綴された状態の測定すべき抗原に対する抗体からなる。この試料溶液を恒温保持緩衝液中に加えるのが有利である。良好な結果は、界面活性物質を恒温保持溶液に、又は凝合体溶液に添加する場合に遠せられる。

界面活性剤を試料溶液自体に添加することはあまり有利ではない。完成した恒温保持溶液中には十分に高い温度が界面活性剤が存在しなければならない。ところが、非常に僅かな量で使用される試料溶液を介して界面活性剤を添加す

性剤としてA、B、C及びDが前記のものである一般式1又は2の化合物を含有しているのが特に有利である。HLB値が24~30の界面活性剤を使用するのが有利である。界面活性剤は試薬中に0.1~5%の濃度で含有されている。

本発明による方法及び試薬を用いて、不均一相中の免疫測定において検出が改良された。更に、本発明により使用した緩衝剤の添加により免疫反応は促進される。更に、結合反応成分の脱離を強めることなく、特に固体への凝合体の非特異的付加のような不所望な副反応を抑制する。

実施例

例1

プラスチック小管をクロラミン-T法により125Iで標識化したTBHに対する抗体で40 μ mol/lの磷酸塩緩衝液中でpH7.4で被覆した。濃度は2 μ g/mlであつた。0.9%塩化ナトリウム及び0.3%牛血清アルブミン、I型からなる溶液で被覆を行なつた。被覆容積は1.5mlであつた。被覆のための恒温保持時間

第1表

は22時間であつた。その後、後被覆溶液1.8mlと共に $\frac{1}{2}$ 時間、後被覆を行なつた。該小管を管開口部を上に向けて24時間乾燥した。次いで、該管を界面活性剤で処理した。この小管により抗原もしくは抗原-抗体-複合体の脱着を測定した。結果を次の第1表に記載した。

界面活性剤	濃度	脱着	
		凝抗体	抗原
破傷風毒素	-	3.2%	1.2%
ツウィーン20(比較)	1%	58%	74%
"	0.1%	50%	55%
"	0.01%	30%	45%
トライトンX100(比較)	1%	61%	85%
"	0.1%	62%	89%
"	0.01%	53%	76%
ブルロニツク764(比較)	1%	64%	85%
"	0.1%	21%	39%
"	0.01%	6%	10%
ブルロニツク768(本)	1%	9%	7%
"	0.1%	5%	6%
"	0.01%	5%	5%
テトロニツク707(本)	1%	5%	-
"	0.1%	4%	-
"	0.01%	4%	-

比較-比較例；HLB < 20の界面活性剤

本-HLB > 20の本発明による界面活性剤

例2

種々の界面活性剤を用いてTBE-テストにおける検出を調べた。この際、SDTAを用いて、ヘパリンを用いて、もしくはクエン酸塩を用いて安定化した血漿を使用した。同時に血清を用いてTBE-テストを実施した。このテストにおいて検出は100%であつた。種々の界面活性剤に関して得られた値を次の表に記載する。

第 2 表

界面活性剤	界面活性剤濃度		EDTA		出		フェンチン血漿
	界面活性剤濃度	界面活性剤濃度	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	
なし	-	-	40-70	40-70	40-70	40-70	-
トライトンX405	0.1%	-	66%	66%	81%	81%	-
ブドウ糖	0.005%	-	88%	88%	89%	89%	89%
ブドウ糖	1%	-	98%	98%	97%	97%	93%
ブドウ糖	1%	1%	105%	105%	98%	98%	99%
ブドウ糖	1%	-	99%	99%	105%	105%	100%
ブドウ糖	1%	1%	106%	106%	100%	100%	112%
ブドウ糖	1%	-	106%	106%	93%	93%	-
ブドウ糖	1%	1%	103%	103%	92%	92%	-
ブドウ糖	1%	-	105%	105%	104%	104%	105%
ブドウ糖	1%	1%	99%	99%	98%	98%	102%
ブドウ糖	1%	2%	98%	98%	98%	98%	99%
ブドウ糖	1%	-	103%	103%	98%	98%	-
ブドウ糖	1%	1%	101%	101%	95%	95%	-
ブドウ糖	1%	-	102%	102%	86%	86%	94%
ブドウ糖	1%	1%	105%	105%	92%	92%	101%
ブドウ糖	1%	-	100%	100%	97%	97%	105%
ブドウ糖	1%	1%	98%	98%	94%	94%	102%
ブドウ糖	1%	2%	96%	96%	83%	83%	96%
ブドウ糖	1%	-	98%	98%	94%	94%	100%
ブドウ糖	1%	1%	97%	97%	94%	94%	99%
ブドウ糖	1%	-	90%	90%	84%	84%	95%
ブドウ糖	1%	1%	98%	98%	96%	96%	101%
ブドウ糖	1%	-	110%	110%	103%	103%	-
ブドウ糖	1%	1%	105%	105%	99%	99%	-
ブドウ糖	1%	-	105%	105%	96%	96%	-
ブドウ糖	1%	1%	107%	107%	103%	103%	-

注：濃度は100%

類似の実験をCBA - テストで実施した。結果はTBE - テストの結果と同様であつた。界面活性剤の濃度が上昇するにつれて血漿中での検出が上昇するだけでなく、ゼロ標準の吸光度が下がるということが確認された。これは、非特異的な複合体結合が界面活性剤の添加により減少したことを示す。

例 3

複合体の非特異的な結合に対する種々の界面活性剤の影響を調べるために、種々の界面活性剤を試験した。結果を第3表にあげた。

界面活性剤	濃度	0標準の吸光度
なし	-	68 mE
ナトロニク707	1%	43 mE
"	2%	26 mE
ナトロニク908	1%	10 mE
ブルロニク768	2%	22 mE
ブルロニク788	2%	18 mE

例 4

本発明により使用した界面活性剤が、0 - 標準の吸光度を高めることなく、TBE - テストをどの程度促進することができるかを試験した。このために種々の界面活性剤を試験した。結果を添付図面に記載した。

曲線1は複合体緩衝液中に添加物のない場合、

曲線2は複合体緩衝液中にナトロニク909

0.5%、

曲線3は複合体緩衝液中にナトロニク909

1.0%、

曲線4は複合体緩衝液中にナトロニク909

1.0% + ナトロニク707 1.0%、

曲線5は複合体緩衝液中にナトロニク909

2.0%、

曲線6は複合体緩衝液中にナトロニク707

1.0% + ナトロニク908 4.0%

をそれぞれ添加した場合である。

例 5

多くのTBE - テストを実施した。この際、本

発明により使用した薬剤で達成することのできる促進を標準に対して決定した。第4表に記載した値が種々の界面活性剤を用いて得られた。

第4表

界面活性剤	濃度 %	標準 ΔE
プルロニク768	1%	0.847 100.5
"	2%	0.926 110
"	5%	1.238 147
プルロニク788	1%	0.775 114
"	2%	0.762 112
"	5%	1.002 147
プルロニク798	1%	0.831 113
"	2%	0.789 112
"	5%	1.213 172
プルロニク738	1%	0.697 102
"	2%	0.695 102
"	5%	0.627 92

4 図面の簡単な説明

添付図面は実施例4の結果を示すグラフ図であり、縦軸は吸光度を、横軸はTBEの量を示す。

曲線1 混合体緩衝液中に添加物をなし。

曲線2 混合体緩衝液中にナトロニク909 0.5%、

曲線3 混合体緩衝液中にナトロニク909 1.0%、

曲線4 混合体緩衝液中にナトロニク909 1.0%+ナトロニク707 1.0%、

曲線5 混合体緩衝液中にナトロニク909 2.0%、

曲線6 混合体緩衝液中にナトロニク707 1.0%+ナトロニク908 4.0%。

代理人 弁理士 矢野 敏 雄

